

머루종자의 적정 추출조건 및 추출 분획물의 Free Radical 소거능 효과

김난영¹ · 김영국¹ · 배기자¹ · 최재호¹ · 문제학² · 박근형² · 오덕환^{1*}

¹강원대학교 바이오산업공학부

²전남대학교 응용생물공학부

Free Radical Scavenging Effect and Extraction Condition of Ethanol Extracts and Fractions of Wild Grape Seed (*Vitis coignetiea*)

Nan-Young Kim¹, Young-Kuk Kim¹, Ki-Ja Bae¹, Jae-Ho Choi¹,
Jea-Hak Moon², Geun-Hyung Park² and Deog-Hwan Oh^{1*}

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Division of Applied Bioscience & Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

Wild grape is a traditional medicine plant in north-eastern part of Asia and has been known to have healing properties for various illnesses. This study was to determine the optimum extraction condition and antioxidant activity of ethanol extracts of wild grape (*V. coignetiea*) seed. Also, organic solvent fractions of hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol were obtained from the ethanol extract of wild grape seed at different temperatures. Total ethanol extraction yield of wild grape seed ranged from 4% to 12% depending on the ethanol concentration, extraction temperature and time condition. The highest extraction yield of 11.9% was obtained at 90% ethanol condition for 12 hour at 70°C. However, the strongest free radical scavenging effect (RC₅₀) with 20.93 µg/mL was observed in 70% ethanol extract of wild grape seed extracted for 6 hour at 70°C, while RC₅₀ with 40.42 µg/mL was observed in 90% ethanol extract for 12 hour at 70°C. Antioxidant activity of ethanol extracts of wild grape seed increased as total phenol contents increased. Among each fraction obtained from organic solvents, ethyl acetate fraction was found to have the strongest RC₅₀ (8.6 µg/mL) and 636.77 mg GAE/g phenol contents.

Key words: wild grape seed, free radical scavenging, total phenol content

서 론

최근 건강에 대한 관심의 증가로 각종 기능성 소재 탐색에 대한 연구가 활발한 가운데 약용 및 식용식물을 비롯한 각종 산채류 및 산림자원 등에 관한 연구가 증대되었다. 육종 분야에 있어서는 이의 생산성과 경제성 및 부가가치를 높이기 위하여 재배의 시도 및 재배종으로의 우수 형질 도입의 시도가 이루어지고 있으며, 기내배양을 이용한 유용물질 생산 및 물질 분리·정제 그리고 상품화까지 우리 생활 속에 “기능성”이란 말이 더 이상 낯설지가 않게 되었다. 이러한 다양한 식물소재들은 각종 의약품과 식품의 보존이나 향을 더하기 위한 첨가제로 개발되고 있으며, 환경에 대한 관심도 증가함에 따라 식품산업공정에 의하여 발생하는 부산물을 이용하여 기능성 소재개발을 위한 연구도 활발히 진행 중에 있다(1-3).

머루(wild grape/*Vitis coignetiea*)는 갈매나무목(*Rhamnales*) 포도과(*Vitaceae*)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 세계

적으로 광범위하게 재배되는 포도와 형상이 비슷하나 산에서 야생으로 자생하며 내한성과 병충해 저항성이 강한 성질을 지녔다(4). 잎은 호생이며 광란형으로 뒷면의 자색털이 있는 것으로 일반적으로 머루라고 불리는 왕머루(*Vitis amurensis*)와는 구분된다. 꽃은 원추화서로 6월~7월에 황록색으로 개화하며 열매는 장과로 포도보다는 검은색으로 9월~10월에 결실한다. 또한 예로부터 민간처방으로 빈혈, 구토, 설사, 두통 등의 치료를 위해 열매, 줄기 및 뿌리가 이용되어 왔다(5). 특히 그중 뿌리는 염증치료에 뛰어난 처방약으로 알려져 있으며 이것에 기여하는 성분은 resveratrol을 중심 구조로 하고 있는 viniferin, amurensin, heyneanol 등으로 알려져 있다(6,7). 머루는 한국, 중국, 일본 등의 동북아시아에 주로 많이 분포하고 있으며 국내에서는 주로 머루주에 대한 연구가 일부 진행되었으나 머루를 이용한 기능성 성분탐색에 관한 연구는 거의 전무하며 중국이나, 일본에서는 머루종자와 뿌리에 대한 성분 연구가 일부 보고되어있는 등 아직 머루

*Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457, Fax: 82-33-250-6457

에 대한 기능성소재로서의 연구는 상당히 미약하다(8-10).

현재 우리나라에서 재배되고 있는 머루(*Vitis coignetiea*)는 내한성 및 병충해 저항성을 지님과 동시에 수량성이 우수한 특성을 지닌 재배에 적합한 품종으로 우리나라에서는 식품산업체보다는 일부 농가에서 조합형태로 머루주스 또는 머루주 생산을 위해 재배하고 있다. 지금까지 머루종자를 이용하여 이를 기능성소재로 활용하기 위한 연구는 전무하기 때문에 본 연구에서는 부산물 자원 활용을 위한 머루 종자의 추출 조건을 탐색하고, DPPH법에 의한 free radical 소거능에 대한 활성을 비교하여 최적 추출 조건의 확립과 항산화 활성을 살펴봄과 동시에 에탄올 추출물의 분획에 의한 항산화 효과를 확인하여 보았다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 머루(*Vitis coignetiea*) 종자는 경기도 파주의 감악산 머루 농원에서 2004년에 재배한 머루종자를 9월에 수확하여 자연건조한 후 분쇄하여 4°C에서 보관하며 사용하였다.

추출 및 분획

시료 50 g에 70%와 90%의 에탄올 500 mL를 가하여 mentle heater에서 열을 가해 환류하면서 추출하였다. 온도는 50°C와 70°C로 설정하여 6시간과 12시간 각 2회 반복 추출하였다(11,12). 추출된 각 시료들은 여과지(Whatman No.2)로 감압 여과를 거쳐 농축하고 동결건조 하여 -70°C에 보관하였다. 추출율은 추출전 건조 머루 종자 분말의 무게에 대해 추출물의 무게 백분율로 계산하였다.

한편, 최적추출조건에서 가장 좋은 항산화활성과 높은 총 페놀함량을 나타내었던 70% ethanol 추출물로부터 극성이 다른 유기용매를 이용하여 순차적으로 분획하였다. 즉, 70% ethanol 추출물과 hexane, 증류수를 1:10:9의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotatory vacuum evaporator로 농축하여 hexane 분획물을 얻고, 수층은 다시 chloroform, ethyl acetate 및 butanol로 분획여두에서 순차적으로 용매 분획한 다음 각 분획물을 농축하여 동결건조하였다. 이것들은 밀봉하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 한편, 각 분획물의 수율은 ethanol 추출물의 동결건조 중량에 대한 각 유기용매 추출물의 동결건조량의 조성비로 각각 나타내었다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 법(13)에 의하여 각 추출물 2.5 mg을 50% 메탄올 용액 5 mL에 녹여서 extraction solution을 만든 다음 이중 0.5 mL를 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL와 반응시켰다. 2~5분 뒤 20% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 10분간 실온에 방치한 후 상층액을 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량의 계산은 위와 같은 동

일 조건하에 gallic acid(Yakuri Pure Chemicals Co., Kyoto)의 농도를 달리하여 흡광도를 측정된 각 값들을 이용하여 추세를 그린 후 각 시료의 총 페놀 값을 gallic acid equivalents(mg GAE/g)으로 나타냈다.

Free radical 소거능

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 free radical 소거능을 검증하기 위하여 여러 농도의 시료를 4 mL의 메탄올에 녹여 1.5×10⁻⁴ M DPPH 메탄올 용액 1 mL를 첨가한 후, 30분간 상온에 방치하고 517 nm에서 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(μg)을 reduction concentration(RC₅₀)으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α-tocopherol의 항산화 활성을 평가 비교하였다(14).

결과 및 고찰

추출 수율

머루 종자로부터 각종 추출 온도와 추출 시간에 따른 에탄올 추출물의 수율을 Table 1에 나타내었다. 전반적으로 에탄올 추출물의 고형분 함량은 4~12%로 나타났으며, 에탄올의 농도 및 추출 온도와 시간이 증가할수록 수율이 증가하였다. 70% 에탄올 추출보다는 90% 에탄올 추출의 수율이 각 3~4%가량 높았으며 50°C 추출보다는 70°C 추출이 약 2% 높았고, 6시간 추출보다는 12시간 추출의 수율이 약 1%씩 높았다. 이와 같은 결과로 미루어보아 추출 수율은 에탄올의 농도, 추출 온도 및 추출 시간에 따라 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. Park과 Oh(15)도 포도종자 추출시 에탄올의 농도 및 추출 온도가 높을수록 수율이 증가한다고 보고한 바 있는데 본 실험 결과에서도 70% 에탄올로 50°C에서 6시간 추출한 추출물의 수율이 약 4.3%에 불과하지만, 90% 에탄올로 70°C에서 12시간 추출한 추출물의 수율이 약 12%로 추출 효율 면에서 가장 뛰어났다.

머루종자 에탄올 추출물의 free radicals 소거능 및 총 페놀 함량

각 추출조건에서 얻은 에탄올 추출물의 free radical 소거능을 Table 2에 나타내었다. 추출 수율은 에탄올의 농도와 추출 온도 및 추출 시간이 증가할수록 높았으나 DPPH 소거

Table 1. Yields of ethanol extract of wild grape seed at various extraction conditions

Ethanol (%)	Temp (°C)	Extraction time (hr)	Yield (%)
70	50	6	4.3
		12	5.3
	70	6	6.9
		12	7.5
90	50	6	7.3
		12	9.5
	70	6	8.5
		12	11.9

Table 2. DPPH radical scavenging effect of ethanol extracts of wild grape seeds at various extraction conditions

Ethanol (%)	Temperature (°C)	RC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	
		6 hr	12 hr
70	50	22.85	22.47
	70	20.93	21.61
90	50	35.08	37.19
	70	26.51	40.42
Control			
α-Tocopherol		18.9	
BHA		16.9	

¹⁾Dose required for a 50% reduction of DPPH radical at 517 nm.

능에 대한 활성은 다른 경향을 보였다. 50°C에서 70% 에탄올로 6시간 추출시 RC₅₀은 22.85 µg/mL을 나타내었으나 90% 에탄올로 6시간 추출하였을 때 RC₅₀은 35.08 µg/mL으로 free radical 소거능이 현저하게 감소하였다. 그러나 12시간 추출시에는 6시간과 비교하여 70% 에탄올 추출물에서는 차이가 없었으며, 90% 에탄올 추출물에서는 약간 감소하였다. 한편, 70°C에서 추출시, 70% 에탄올 추출물은 추출시간에 따른 영향은 거의 없었으며 6~12시간 추출시 RC₅₀이 20.93~21.61 µg/mL로 가장 강한 free radical 소거능을 나타내었다. 반면에, 90% 에탄올 추출물은 70°C에서 6시간 추출시 RC₅₀이 26.51 µg/mL이었으나 12시간 추출시 RC₅₀은 40.42 µg/mL로 현저하게 떨어졌다.

같은 조건하에서 추출된 각 추출물의 총 페놀 함량을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 총 페놀 함량은 70% 에탄올 추출물의 경우, 50°C에서 6시간 추출시 327.47 mg GAE/g을 나타내었으나 90% 에탄올 추출물에서는 293.25 mg GAE/g로 감소하였다. 반면에, 추출온도를 70°C로 높일 경우, 70% 에탄올 추출물의 경우 6시간 추출시 330.71 mg GAE/g으로 약간 증가하였고 90% 에탄올 추출물도 312.54 mg GAE/g으로 50°C에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 12시간 추출시에는 70% 에탄올 추출물에서는 총 페놀 함량의 차이가 거의 없었으며, 90% 에탄올 추출물에서는 243.00 mg GAE/g으로 현저하게 감소하였다. 본 연구결과, 머루종자 에탄올 추출물은 70°C에서 70% 에탄올로 추출하였을 때 추출수율은 다른 추출조건에 비하여 상대적으로 낮았지만 free radical 소거능과 페놀함량이 가장 높은 것으로 나타났

Table 3. Total phenol contents of wild grape seed extracts at various extraction conditions

Ethanol (%)	Temperature (°C)	Total phenol content (mg GAE ¹⁾ /g)	
		6 hr	12 hr
70	50	327.47	327.06
	70	330.71	315.73
90	50	293.25	281.80
	70	312.54	243.00

¹⁾GAE: gallic acid equivalents.

으며 머루종자 에탄올 추출물의 free radical 소거능이 총 페놀 함량과 밀접하게 관련이 있는 것으로 나타났다. 추출 시간과 온도에 따른 수율과 free radical 소거능을 비교하였을 때, 에탄올 농도별로 추출온도 및 시간에 따라 free radical 소거능에 영향을 미치는 것이 많은 차이가 있는 것으로 사료되며, 특히 90% 에탄올 추출물이 70% 에탄올 추출물에 비하여 70°C에서 12시간 추출시 현저하게 free radical 소거능과 총 페놀 함량이 감소하는 것으로 보아 추출 온도와 추출 시간의 적절한 선택이 매우 중요한 것으로 사료된다(16, 17). Kim 등(18)도 포도종자 90% 에탄올 추출시 70°C에서 12시간 추출할 경우 6시간 추출에 비해 총 페놀 함량과 free radical 소거능이 감소한다고 보고하였으며, Choi 등(19)도 노루궁뎅이 버섯의 추출물의 free radical 소거능이 일정 고온 이상에서는 추출물의 항산화 활성이 떨어지는 것으로 보고하였다. 그러므로 좀더 과학적인 최적 추출 조건을 탐색하기 위하여 다양한 온도와 시간별 추출 실험을 토대로 Yoon 등(20)의 연구 사례와 같이 회귀분석에 의한 통계적 수치가 제시되면 더욱 좋을 것으로 나타났다.

머루 종자 분획물의 free radical 소거능 및 페놀 함량

본 실험에서 가장 높은 free radical 소거능과 페놀 함량을 나타낸 70% 에탄올로 70°C에서 6시간 추출한 추출물로부터 유기 용매별로 순차적으로 분획한 결과는 Table 4와 같다. 추출 수율은 폴리페놀 화합물들을 많이 함유하고 있는 ethyl acetate와 water 분획층에서 약 28%로 가장 높았으며, butanol 분획층에서 20%였고 hexane과 chloroform 분획층이 각각 9.3%, 7%로 지용성 물질이 많이 추출되는 비극성 용매계에서의 수율은 상대적으로 적은 편이었다. 또한 비극성 용매계와 비교해 보았을 때 극성이 높은 유기용매 분획으로 갈수록 수율이 증가하는 것으로 보아 70% 에탄올에 추출되는 머루 종자의 물질은 대부분 수용성물질로 추정되며, 이는 포도 종자에서도 마찬가지로 용매의 극성이 높아짐에 따라 분획물의 수율이 증가한다고 보고한 바 있다(21). 한편, 머루 종자 분획물의 free radical 소거능(RC₅₀)은 ethyl acetate 분획층에서 8.65 µg/mL로 가장 높았으며, butanol(28.11 µg/mL), 물(41.15 µg/mL), chloroform(48.43 µg/mL), hexane(297.20 µg/mL)층으로 나타났다. 에탄올 추출물의 결과에서와 마찬가지로, 머루종자 분획물의 총 페놀 함량도 free rad-

Table 4. Extraction yields, DPPH radical scavenging effect and total phenol contents of organic solvent fractions obtained from 70% ethanol extracts of wild grape seeds

Fraction ¹⁾	Yields (%)	RC ₅₀ (µg/mL)	Total phenol (mg GAE/g)
Hexane	9.3	297.20	54.08
Chloroform	7.0	48.43	171.56
Ethyl acetate	27.7	8.65	636.77
Butanol	20.0	28.11	296.94
Water	27.7	41.15	236.24

¹⁾Extracted with 70% ethanol at 70°C for 6 hours two times.

ical 소거능에 비례하여 나타났다. Ethyl acetate 분획층에서 636.77 mg GAE/g으로 가장 높은 페놀 함량을 나타내었으며, butanol(296.46 mg GAE/g, 물(236.24 mg GAE/g), chloroform(171.56 mg GAE/g), hexane(54.08 mg GAE/g)층 순으로 나타났다.

한편, Kim 등(18)은 포도종자의 경우 hexane으로 탈지한 후 건조한 종자를 에탄올이나 유기용매로 추출하였을 때 탈지하지 않은 종자에 비하여 현저하게 free radical 소거능과 총 페놀 함량이 증가한다고 보고한 바 있으며(data not shown), 머루종자의 경우도 시료를 탈지한 후 에탄올로 추출하였을 때 비탈지 머루종자 추출물에 비하여 free radical 소거능이 증가할 것으로 기대된다. 또한, Bonilla 등(3)의 보고에 의하면 물:추출물보다 ethyl acetate 추출물에서 free radical 소거능이 훨씬 뛰어났으며 추출물의 성분이 대부분 flavonoid계 물질로 분석된 것으로 보아 머루종자에도 flavonoid 관련 물질이 풍부할 것으로 사료된다. 추후 이와 관련된 연구가 더 심도있게 검토되어야 하며 머루종자 추출물의 기능성소재로서의 개발 가능성을 탐색하기 위하여 현재 탈지 및 비탈지 머루종자 추출물로부터 항균 및 항산화기능에 효능이 좋은 물질을 분리 정제중에 있다.

요 약

식품 산업에서 발생하는 부산물의 가치를 재고하는데 있어서 머루 종자 에탄올 추출물을 대상으로 free radical 소거능을 탐색하여 머루종자의 기능성을 찾고자 본 실험을 수행하였다. 그 결과, 추출수율은 에탄올 농도, 추출온도 및 시간에 따라 전반적으로 4~12%를 나타내었으며 90% 에탄올로 70°C에서 12시간 추출한 추출물의 수율은 11.9%로 가장 높았지만 free radical 소거능(RC₅₀)은 40.42 µg/mL로 나타났다. 그러나 70% 에탄올로 70°C에서 6시간 추출을 하였을 때 추출수율은 6.9%를 나타냈지만 RC₅₀은 20.93 µg/mL로 가장 높았고 총 페놀 함량도 330.71 mg GAE/g으로 가장 높게 나타났다. 본 연구결과, free radical 소거능이 높을수록 총 페놀 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며 머루종자 에탄올 추출물의 free radical 소거능이 총 페놀 함량과 밀접하게 관련이 있는 것으로 나타났다. 한편, 70% 에탄올을 70°C, 6시간 추출물로부터 유기 용매별로 순차적으로 분획한 결과, 추출수율은 폴리페놀 화합물들을 많이 함유하고 있는 ethyl acetate 분획층에서 약 28%로 높았으며, RC₅₀도 ethyl acetate 분획층에서 8.65 µg/mL로 가장 높았고 총 페놀 함량도 ethyl acetate 분획층에서 636.77 mg GAE/g으로 가장 높게 나타났다.

문 헌

- Lu YR, Foo LY. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem* 68: 81-85.
- Negro C, Tommasi L, Miceli A. 2003. Phenolic compounds

- and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technol* 87: 41-44.
- Bonilla F, Mayen M, Merida J, Medina M. 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem* 66: 209-215.
- Pearson RC, Goheen AC. 1990. Compendium of grape diseases. APS Press, St. Paul, MN. p 93.
- Jiangsu New Medical College. 1977. *Dictionary of Chinese traditional medicine*. Shanghai. Vol 2, p 2315.
- Kai SH, Mao L, Gui FC. 2001. Anti-inflammatory tetramer of reveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochem* 58: 357-362.
- Kai SH, Mao L, Lin NY, Man K. 2000. Four novel oligostilbenes from the root of *Vitis amurensis*. *Tetrahedron* 56: 1321-1329.
- Kim SK. 1996. Deacidification of new wild grape wine. *Korean J Food Nutr* 9: 265-270.
- Koh KH, Kim HW, Han SH, Park YH, Lee CH. 2003. Polyphenolic compounds and superoxide radical scavenging activity of *Moru-Ju*. *Food Sci Biotechnol* 12: 290-297.
- Wang JN, Hano Y, Nomura T, Chen YJ. 2000. Procyanidins from the seeds of *Vitis amurensis*. *Phytochemistry* 53: 1097-1102.
- Park SJ, Lee HY, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from Campbell Early grape (*Vitis labruscana* B.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 115-118.
- Park SJ, Park BG, Lee HY, Oh DH. 2002. Biological activities of ethanol extracts and fractions of Black Olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Preservation* 9: 338-344.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J Agric Food Chem* 50: 6490-6496.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
- Park SJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of Black Olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 121-124.
- Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB. 2003. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.
- Bernard F, Pierre WT, Francois H, Laurence B, Alain D, Jean MM. 1997. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* test. *Life Sci* 61: 2103-2110.
- Kim YK, Lee HY, Oh DH. 2004. Changes in antioxidative activity and total polyphenols of crude and defatted grape seed extract by extraction condition and storage. *Korean J Food Preservation* 11: 455-460.
- Choi MA, Park NY, Jeong YJ. 2004. Optimization of hot water extraction conditions from *Hericium erinaceus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1068-1073.
- Yoon SR, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH. 2003. Changes in phenolic compounds properties of Rubi Fructus extract depending on extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 338-345.
- Jung HY, Yoon SJ. 2003. Antioxidant activity of grape seed ethanol extract according to serial solvent fractionation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 338-345.